01/01708

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2001年11月8日 (08.11.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/83545 A1

(51) 国際特許分類[7]: C07K 14/47, C12N 15/12, C12P 21/02, C07K 16/18, A61K 39/395, G01N 33/50

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/03672

(22) 国際出願日: 2001年4月27日 (27.04.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-127547 2000年4月27日 (27.04.2000) JP
特願2001-64862 2001年3月8日 (08.03.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大久保尚一 (OKUBO, Shoichi) [JP/JP]; 〒300-1234 茨城県牛久市中央1丁目4番地23 Ibaraki (JP). 菊地久仁子 (KIKUCHI, Kuniko) [JP/JP]; 〒302-0024 茨城県取手市新町五丁目8-18-101号 Ibaraki (JP). 新谷 靖 (SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ703号 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: 青山 葆, 外 (AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROETIN AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: 新規タンパク質およびその用途

(57) Abstract: A novel gene likely inhibiting the onset and progress of cancer. A protein having an amino acid sequence which is the same or substantially the same as the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:4 or its salt; a polynucleotide encoding the same; and medicinal use, etc. thereof.

(57) 要約:

癌の発生や進展を抑制する可能性のある新たな遺伝子を見出し、その用途を開発する。

配列番号: 4で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩およびそれをコードするポリヌクレオチドを提供する。それらの医薬用等の用途も提供する。

WO 01/83545 A1

明　細　書

新規タンパク質およびその用途

技術分野

本発明は、新規タンパク質およびその用途に関する。

背景技術

我々ヒトを含む多くの生物体を構成する個々の細胞が、細胞外の環境を正確に把握し迅速に対応していくことは、機能的な細胞活動にとって必要不可欠である。その中で重要な働きをしているのが細胞表面にある種々の分子であり、とりわけ受容体を含む多くのタンパク分子が中心的役割を担っている。例えば、多くのTyr kinase 型の受容体は、細胞外のリガンドに対応して細胞内の特定のタンパクをリン酸化することによって機能している。またある種の白血球細胞に発現している表面タンパクの中には、細胞間相互作用を通して他の細胞に働きかけることにより体内の免疫反応を担っている。これらのタンパク分子の多くは何らかの形で細胞膜上に固定された状態で存在している。しかし、酵素的にあるいは他の機構によって細胞外へ遊離し、分泌型としても機能しているものもある。このような分泌型のタンパクには、本来の機能を増強あるいは拮抗するものや、全く異なる機能を持つものなど様々である。例えば、多くの分泌型の受容体は、膜上の受容体とリガンドをめぐって競合する。また、 CD55 や CD59 などの分子は、分泌型か膜結合型かを問わず補体系の抑制に働く（Immunology Today 20, 576-582 (1999)）。

一方癌関連の遺伝子としては、細胞の増殖因子あるいはその受容体、転写因子やシグナル伝達に関わるタンパクなど多数の遺伝子が見出だされている。例えば、脳腫瘍に関係する PDGF (Nature 362, 801 (1997)) や乳癌や胃癌、神経芽腫に関与する c-mycや N-myc、大腸癌や白血病に関与する Ki-ras や N-ras などが挙げられる。これらの遺伝子は特定の細胞や組織が癌化したときに見出された特異的なタンパクや遺伝子を分析し、その配列の情報をもとにして同定されたもの

であり、すべてまたは多くの癌細胞や組織に普遍的に発現しているものではない。また、ヒトを含む哺乳類の免疫系は非常に複雑であり、単一の遺伝子産物によってすべての癌の発生・進行のメカニズムを説明することは困難であることが予想される。

そこで、癌の発生や進展に関わるような癌関連遺伝子あるいは癌化に伴なって発現増強されるようないわゆる癌抗原分子と言われるような一群のタンパクをコードする遺伝子が近年注目されているが、特に免疫系に対して何らかの関与を有することにより癌の発生や進展を直接あるいは間接的に亢進する可能性のある新たな遺伝子の発見が望まれている。

発明の概要

本発明者らは上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、予想されるアミノ酸配列上でN末端およびC末端の両方に疎水性アミノ酸のクラスターを持つ膜結合型および／または分泌型のタンパクをコードしている新規遺伝子を見出した。

本発明者らはこれらの知見に基づいて、さらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

（1） 配列番号：４で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするタンパク質またはその塩、

（2） 上記（1）記載のタンパク質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

（3） 上記（1）記載のタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ、

（4） 配列番号：３で表わされる塩基配列を有する上記（3）記載のＤＮＡ、

（5） 上記（2）記載の部分ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ、

（6） 上記（3）または上記（5）記載のＤＮＡを含有する組換えベクター、

（7） 上記（6）記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

（8） 上記（7）記載の形質転換体を培養し、上記（1）記載のタンパク質

または上記（2）記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法、

（9） 上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体、

（10） 上記（3）もしくは上記（5）記載のDNAまたは上記（9）記載の抗体を含有してなる診断剤、

（11） 上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩あるいは上記（9）記載の抗体を含有してなる医薬、

（12） 癌の予防・治療剤である上記（11）記載の医薬、

（13） 上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、

（14） 上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

（15） 上記（13）記載のスクリーニング方法または上記（14）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩、

（16） 上記（15）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（17） 癌の予防・治療剤である上記（16）記載の医薬、

（18） 抗癌作用を有する医薬を製造するための①上記（1）記載のタンパ

ク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または②上記（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用、

（１９） ①上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または②上記（１２）記載のスクリーニング方法または上記（１３）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とする癌の予防・治療方法、

（２０） 上記（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、

（２１） 上記（２０）記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬、

（２２） 免疫抑制剤または抗炎症剤である上記（２１）記載の医薬、

（２３） 免疫抑制作用または抗炎症作用を有する医薬を製造するための①上記（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、あるいは上記（9）記載の抗体の使用、

（２４） 上記（１３）記載のスクリーニング方法または上記（１４）記載のスクリーニング用キットを用いて得られる上記（1）記載のタンパク質もしくはその塩、上記（2）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、あるいは上記（9）記載の抗体を哺乳動物に投与することを特徴とする免疫抑制方法または炎症の治療方

法などを提供する。

さらには、本発明は、

（２５）配列番号：４で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、配列番号：４で表されるアミノ酸配列と約７０％以上、好ましくは約８０％以上、より好ましくは約９０％以上、さらに好ましくは約９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列である上記（１）記載のタンパク質またはその塩、

（２６）配列番号：４で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列が、①配列番号：４で表されるアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：４で表されるアミノ酸配列に１～１０個（好ましくは、１～５個（より好ましくは、１～３個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：４で表されるアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または④それらを組み合わせたアミノ酸配列である上記（１）記載のタンパク質またはその塩、

（２７）（ｉ）上記（１）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に基質を接触させた場合と、（ii）上記（１）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に基質および試験化合物を接触させた場合における、上記（１）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を測定し、比較することを特徴とする上記（１３）記載のスクリーニング方法、

（２８）上記（９）記載の抗体と、被検液および標識化された上記（１）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはそれらの塩とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された上記（１）記載のタンパク質もしくはその塩、または上記（２）記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の割合を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のタンパク質

もしくは上記（３）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法、

（２９）被検液と担体上に不溶化した上記（９）記載の抗体および標識化された上記（９）記載の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の上記（１）記載のタンパク質もしくは上記（２）記載の部分ペプチドまたはその塩の定量法などを提供する。

図面の簡単な説明

図１は、ＣＳＰ－ＦＬＡＧのＣＯＳ－７細胞での発現を示すウエスタンブロットである。

図２Ａは、CHO-K1／hNKG2D-11細胞に対してCSP2-Fc 発現 COS7 細胞の培養上清濃縮物を加えた場合のFITCのヒストグラムであり、Ｂは、CHO-K1 細胞（コントロール）に対して実施例６で得られた CSP2-Fc 発現 COS7 細胞の培養上清濃縮物を加えた場合のFITCのヒストグラムであり、Ｃは、CHO-K1／hNKG2D-11細胞に対してMock プラスミド導入 COS7 細胞の培養上清濃縮物を加えた場合のFITCのヒストグラムであり、ＤはＡ～Ｃを重ね合わせたヒストグラムである。

発明の実施の形態

本発明の配列番号：４で表わされるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質（以下、本発明のタンパク質と称する）は、ヒトや温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、ニワトリ、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サルなど）の細胞（例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、

視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など、または血球系の細胞もしくはその培養細胞（例えば、MEL、M1、CTLL－2、HT－2、WEHI－3、HL－60、JOSK－1、K562、ML－1、MOLT－3、MOLT－4、MOLT－10、CCRF－CEM、TALL－1、Jurkat、CCRT－HSB－2、KE－37、SKW－3、HUT－78、HUT－102、H9、U937、THP－1、HEL、JK－1、CMK、KO－812、MEG－01など）に由来するタンパク質であってもよく、合成タンパク質であってもよい。

配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列などがあげられる。

本発明の配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するタンパク質としては、例えば、上記の配列番号：4で表わされるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有し、配列番号：4で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

実質的に同質の活性としては、例えば、NKG2Dに対する結合活性、免疫細胞の活性化などがあげられる。

実質的に同質とは、それらの活性が性質的に（例、生理化学的に、または薬理学的に）同質であることを示す。したがって、NKG2Dに対する結合活性、免疫細胞の活性化などの活性が同等（例、約0．1～100倍、好ましくは約0．5～10倍、より好ましくは約0．5～2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度、タンパク質の分子量などの量的要素は異なっていてもよい。

NKG2Dに対する結合活性は、ELISA法等の自体公知の方法よって測定すれば良い。また、例えば、後に記載するスクリーニング方法に従って測定する

こともできる。

免疫細胞の活性化の測定は、自体公知の方法に準じて行なうことができるが、例えば、免疫細胞活性化の指標として、ひとつは細胞の増殖を調べる方法がある。これは詳細には細胞内の DNA 合成を測定するもので、通常 thymidine またはその誘導体の取込みとして定量できる。すなわち [^{3}H]thymidine の取込みをその放射活性を指標にして定量する方法や、thymidine の誘導体である bromodeoxiuridine (BrdU) の取り込みを BrdU に特異的な抗体を用いて定量する方法などがある。別法として、免疫細胞の活性化に伴なう各種サイトカイン等の産生を調べてもよい。すなわち詳細には、活性化に伴なって培地中または血清中に分泌されてくる interleukin 類 (IL-1、IL-2、IL-3I、L-4 等) や interferon 類 (alpha、beta、gamma) TNF、GM-CSF、各種ケモカイン類等をそれらに特異的な抗体を用いて測定する。

また、本発明のタンパク質としては、例えば、①配列番号：４で表わされるアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、②配列番号：４で表わされるアミノ酸配列に１～１０個（好ましくは、１～５個（より好ましくは、１～３個））のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、③配列番号：４で表わされるアミノ酸配列に１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、④配列番号：４で表わされるアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または⑤それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質などのいわゆるムテインも含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置としては、特に限定されない。

本明細書におけるタンパク質は、ペプチド標記の慣例に従って左端がＮ末端（アミノ末端）、右端がＣ末端（カルボキシル末端）である。配列番号：４で表わされるアミノ酸配列を含有するタンパク質をはじめとする、本発明のタンパク質は、Ｃ末端が通常カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート(－

COO^-）であるが、C末端がアミド（$-CONH_2$）またはエステル（$-COOR$）であってもよい。

ここで、エステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、n－プロピル、イソプロピルもしくはn－ブチルなどのC_{1-6}アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどのC_{3-8}シクロアルキル基、例えば、フェニル、α－ナフチルなどのC_{6-12}アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル－C_{1-2}アルキル基もしくはα－ナフチルメチルなどのα－ナフチル－C_{1-2}アルキル基などのC_{7-14}アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のタンパク質がC末端以外にカルボキシル基（またはカルボキシレート）を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のタンパク質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば、上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のタンパク質には、N末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{1-6}アルカノイルなどのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、生体内で切断されて生成するN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基（例えば－OH、－SH、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など）が適当な保護基（例えば、ホルミル基、アセチル基などのC_{1-6}アルカノイル基などのC_{1-6}アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖タンパク質などの複合タンパク質なども含まれる。

本発明のタンパク質の具体例としては、例えば、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列を有するヒト由来（好ましくはヒト腎臓由来）のタンパク質などが用いられる。

本発明のタンパク質の部分ペプチドとしては、上記した本発明のタンパク質の部分ペプチドであって、好ましくは、上記した本発明のタンパク質と同様の活性（例、ＮＫＧ２Ｄに対する結合活性、免疫細胞の活性化作用など）を有するもの

であればいかなるものでもよい。例えば、本発明のタンパク質の構成アミノ酸配列中の少なくとも２０％以上、好ましくは５０％以上、さらに好ましくは７０％以上、より好ましくは９０％以上、最も好ましくは９５％以上のアミノ酸配列を有し、ＮＫＧ２Ｄに対する結合活性または免疫細胞の活性化作用を有するペプチドなどが用いられる。

また、本発明の部分ペプチドは、そのアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１～１０個（好ましくは、１～５個（より好ましくは、１～３個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の１～５個（好ましくは、１～３個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

本発明の部分ペプチドとしてより具体的には、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列の第２４～２５５番目の部分アミノ酸配列を有する部分ペプチド、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列の第３１～２５５番目の部分アミノ酸配列を有する部分ペプチド、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列の第２６～２５５番目の部分アミノ酸配列を有する部分ペプチド、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列の第２５～２５５番目の部分アミノ酸配列を有する部分ペプチド、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列の第２７～２５５番目の部分アミノ酸配列を有する部分ペプチドなどが挙げられる。

また、本発明の部分ペプチドはＣ末端が通常カルボキシル基（－ＣＯＯＨ）またはカルボキシレート（－COO^-）であるが、上記した本発明のタンパク質のごとく、Ｃ末端がアミド（－$CONH_2$）またはエステル（－ＣＯＯＲ）（Ｒは上記と同意義を示す）であってもよい。

さらに、本発明の部分ペプチドには、上記した本発明のタンパク質と同様に、Ｎ末端のアミノ酸残基（例、メチオニン残基）のアミノ基が保護基で保護されているもの、Ｎ端側が生体内で切断され生成したグルタミン残基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

また、本発明の部分ペプチドは抗体作成のための抗原として用いることができるので、必ずしもＮＫＧ２Ｄに対する結合活性または免疫細胞の活性化作用を有する必要はない。

本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたは本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドをコードするＤＮＡは、自体公知の方法で標識化されていてもよく、具体的にはアイソトープ化されたもの、蛍光標識されたもの（例えば、フルオレセインなどによる蛍光標識）、ビオチン化されたもの、酵素標識されたものなどが挙げられる。

本発明のタンパク質または部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される酸（例、無機酸、有機酸）や塩基（例、アルカリ金属塩）などとの塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蓚酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

本発明のタンパク質またはその塩は、上記したヒトや温血動物の細胞または組織（特に腎臓など）から自体公知のタンパク質の精製方法によって製造することもできるし、後に記載するタンパク質をコードするＤＮＡを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後に記載するペプチド合成法に準じて製造することもできる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞（特に腎臓など）から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

ヒトや哺乳動物の組織または細胞（特に腎臓など）から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のタンパク質、部分ペプチド、もしくはそれらの塩、またはそれらのアミド体の合成には、通常市販のタンパク質合成用樹脂を用いることができる。そのような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、４－ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、４－メチルベンズヒドリルアミン樹脂、ＰＡＭ樹脂、４－ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、４－（2',4'-ジメトキシフェニル－ヒドロキシメチル）フェノキシ樹脂、４－（2',4'-ジメトキシフェニル－Fmocアミノエチル）フェノキシ樹脂などを挙げることができる。このような樹脂を用い、α－アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とするタンパク質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂からタンパク質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施し、目的のタンパク質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、タンパク質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル）カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化にはラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt)とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、タンパク質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、Ｎ，Ｎ－ジメチルホルムアミド，Ｎ，Ｎ－ジメチルアセトアミド，Ｎ－メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン，クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ピリジン，ジオキサン，テトラヒドロフランなどのエーテ

ル類、アセトニトリル，プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル，酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度はタンパク質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－２０℃～５０℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導体は通常１．５～４倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行なうことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ｔ－ペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、４－メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、２－ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

カルボキシル基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ｔ－ブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、２－アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステル、４－ニトロベンジルエステル、４－メトキシベンジルエステル、４－クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化）、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ｔ－ブトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級（C_{1-6}）アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロ

ピラニル基、t-ブチル基などである。

チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl_2-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、t-ブチルなどが用いられる。

ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、Trt、Fmocなどが用いられる。

原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。

保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスルフィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護

基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

タンパク質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（タンパク質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端のα－アミノ基の保護基のみを除いたタンパク質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去したタンパク質とを製造し、この両タンパク質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護タンパク質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗タンパク質を得ることができる。この粗タンパク質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望のタンパク質のアミド体を得ることができる。

タンパク質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸のα－カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、タンパク質のアミド体と同様にして、所望のタンパク質のエステル体を得ることができる。

本発明の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のタンパク質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の部分ペプチドを構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法があげられる。

①M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発、第14巻、ペプチド合成、広川書店

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。

本発明のタンパク質をコードするＤＮＡとしては、上記した本発明のタンパク質をコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、上記した細胞・組織よりtotalＲＮＡまたはｍＲＮＡ画分を調製したものを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、ＲＴ-ＰＣＲ法と略称する）によって増幅することもできる。

本発明のタンパク質をコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡを含有するＤＮＡ、または配列番号：３で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性（例、ＮＫＧ２Ｄに対する結合活性、免疫細胞の活性化作用など）を有するタンパク質をコードするＤＮＡなどであれば何れのものでもよい。

ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約１９～４０ｍＭ、好ましくは約１９～２０ｍＭで、温度が約５０～７０℃、好ましくは約６０

～６５℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約１９mMで、温度が約６５℃の場合が好ましい。

より具体的には、配列番号：４で表わされるアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするＤＮＡとしては、配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、上記した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムＤＮＡ、ゲノムＤＮＡライブラリー、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡ、上記した細胞・組織由来のｃＤＮＡライブラリー、合成ＤＮＡのいずれでもよい。

本発明の部分ペプチドをコードするＤＮＡとしては、例えば、配列番号：３で表わされる塩基配列を有するＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡ、または配列番号：３で表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質をコードするＤＮＡの部分塩基配列を有するＤＮＡなどが用いられる。

本発明のタンパク質または部分ペプチド（以下、これらタンパク質等をコードするＤＮＡのクローニングおよび発現の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）を完全にコードするＤＮＡのクローニングの手段としては、本発明のタンパク質の部分塩基配列を有する合成ＤＮＡプライマーを用いて自体公知のＰＣＲ法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだＤＮＡを本発明のタンパク質の一部あるいは全領域をコードするＤＮＡ断片もしくは合成ＤＮＡを用いて標識したものとのハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）２nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明

書に記載の方法に従って行なうことができる。

ＤＮＡの塩基配列の変換は、公知のキット、例えば、Mutan™-G（宝酒造（株））、Mutan™-K（宝酒造（株））などを用いて、Gapped duplex法やKunkel法などの自体公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化されたタンパク質をコードするＤＮＡは目的によりそのまま、または、所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該ＤＮＡはその５’末端側に翻訳開始コドンとしてのＡＴＧを有し、また３’末端側には翻訳終止コドンとしてのＴＡＡ、ＴＧＡまたはＴＡＧを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成ＤＮＡアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のタンパク質の発現ベクターは、例えば、（イ）本発明のタンパク質をコードするＤＮＡから目的とするＤＮＡ断片を切り出し、（ロ）該ＤＮＡ断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例、ｐＢＲ３２２、ｐＢＲ３２５、ｐＵＣ１２、ｐＵＣ１３）、枯草菌由来のプラスミド（例、ｐＵＢ１１０、ｐＴＰ５、ｐＣ１９４）、酵母由来プラスミド（例、ｐＳＨ１９、ｐＳＨ１５）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス，ワクシニアウイルス，バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、ｐＡ１－１１、ｐＸＴ１、ｐＲｃ／ＣＭＶ、ｐＲｃ／ＲＳＶ、ｐｃＤＮＡＩ／Ｎｅｏなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、ＳＲαプロモーター、ＳＶ４０初期プロモーター、ＨＩＶ・ＬＴＲプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＨＳＶ-ＴＫプロモーターなどがあげられる。

これらのうち、ＣＭＶ（サイトメガロウイルス）プロモーター、ＳＲαプロモーターなどを用いるのが好ましい。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、ｔｒ

pプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、λPLプロモーター、lppプロモーター、T7プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等があげられる。特に、dhfr遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、組換え体細胞をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のタンパク質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、α－アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MFα・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、α－インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のタンパク質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) Ｋ１２・ＤＨ１〔プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ)，６０巻，１６０(１９６８)〕，ＪＭ１０３〔ヌクイレック・アシッズ・リサーチ，(Nucleic Acids Research)，９巻，３０９(１９８１)〕，ＪＡ２２１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)〕，１２０巻，５１７(１９７８)〕，ＨＢ１０１〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー，４１巻，４５９(１９６９)〕，Ｃ６００〔ジェネティックス (Genetics)，３９巻，４４０(１９５４)〕などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サブチルス (Bacillus subtilis) ＭＩ１１４〔ジーン，２４巻，２５５(１９８３)〕，２０７－２１〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)，９５巻，８７(１９８４)〕などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) ＡＨ２２、ＡＨ２２Ｒ－、ＮＡ８７－１１Ａ、ＤＫＤ－５Ｄ、２０Ｂ－１２、シゾサッカロマイセス ポンベ (Schizosaccharomyces pombe) ＮＣＹＣ１９１３，ＮＣＹＣ２０３６、ピヒア パストリス (Pichia pastoris) ＫＭ７１などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがＡｃＮＰＶの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (Spodoptera frugiperda cell；Ｓｆ細胞)、Trichoplusia niの中腸由来のＭＧ１細胞、Trichoplusia niの卵由来のHigh Five™細胞、Mamestra brassicae由来の細胞またはEstigmena acrea由来の細胞などが用いられる。ウイルスがＢｍＮＰＶの場合は、蚕由来株化細胞 (Bombyx mori Ｎ 細胞；ＢｍＮ細胞) などが用いられる。該Ｓｆ細胞としては、例えば、Ｓｆ９細胞 (ATCC CRL1711)、Ｓｆ２１細胞 (以上、Vaughn, J.L.ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー

(Nature)，３１５巻，５９２(１９８５)]。

動物細胞としては、例えば、サル細胞ＣＯＳ－７（以下、ＣＯＳ－７細胞と略記）、Vero，チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ細胞と略記）、ｄｈｆｒ遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞ＣＨＯ（以下、ＣＨＯ（ｄｈｆｒ⁻）細胞と略記）、マウスＬ細胞、マウスＡｔＴ－２０、マウスミエローマ細胞、ラットＧＨ３、ヒトＦＬ細胞などが用いられる。さらに、各種の正常ヒト細胞、例えば肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサンギウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、Ｔ細胞、Ｂ細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくは癌細胞など）などを用いることも可能である。

エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンジイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），６９巻，２１１０(１９７２)やジーン（Gene），１７巻，１０７(１９８２)などに記載の方法に従って行なうことができる。

バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス（Molecular & General Genetics），１６８巻，１１１(１９７９)などに記載の方法に従って行なうことができる。

酵母を形質転換するには、例えば、メソッズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology），１９４巻，１８２－１８７（１９９１）、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），７５巻，１９２９（１９７８）などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー（Bio/Technology），6, 47-55(1988)）などに記載の方法に従って行なうことが

できる。

動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊８　新細胞工学実験プロトコール．２６３－２６７（１９９５）（秀潤社発行）、ヴィロロジー（Virology），５２巻，４５６（１９７３）に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、タンパク質をコードするＤＮＡを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得ることができる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどがあげられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のｐＨは約５～８が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むＭ９培地〔ミラー（Miller），ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス（Journal of Experiments in Molecular Genetics），４３１－４３３，Cold Spring Harbor Laboratory, New York １９７２〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、３β－インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約１５～４３℃で約３～２４時間行ない、必要により、通気や撹拌を加えることもできる。

宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約３０～４０℃で約６～２４時間行ない、必要により通気や撹拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホールダー（Burkholder）最少培地〔Bostian, K. L. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），７７巻，４５０５（１９８０）〕や０．５％カザミノ酸を含有するＳＤ培地〔Bitter, G. A. ら、プロシージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシイズ・オブ・ザ・ユーエスエー（Proc. Natl. Acad. Sci. ＵＳＡ），８１巻，５３３０（１９８４）〕があげられる。培地のｐＨは約５～８に調整するのが好ましい。培養は通常約２０℃～３５℃で約２４～７２時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium（Grace, T.C.C.,ネイチャー（Nature），195, 788 (1962)）に非動化した１０％ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のｐＨは約６．２～６．４に調整するのが好ましい。培養は通常約２７℃で約３～５日間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約５～２０％の胎児牛血清を含むＭＥＭ培地〔サイエンス（Science），１２２巻，５０１（１９５２）〕，ＤＭＥＭ培地〔ヴィロロジー（Virology），８巻，３９６（１９５９）〕，ＲＰＭＩ １６４０培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション（The Journal of the American Medical Association）１９９巻，５１９（１９６７）〕，１９９培地〔プロシージング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン（Proceeding of the Society for the Biological Medicine），７３巻，１（１９５０）〕などが用いられる。ｐＨは約６～８であるのが好ましい。培養は通常約３０℃～４０℃で約１５～６０時間行ない、必要に応じて通気や撹拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞内または細胞外に本発明のタンパク質を生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のタンパク質を分離精製するには、例えば、下記の方法

により行なうことができる。

本発明のタンパク質を培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過によりタンパク質の粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX－１００™などの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中にタンパク質が分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれるタンパク質の精製は、自体公知の分離・精製法を適宜組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈澱法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られるタンパク質が遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

なお、組換え体が産生するタンパク質を、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

かくして生成する本発明のタンパク質またはその塩の存在または活性は、標識

したリガンドとの結合実験および特異抗体を用いたエンザイムイムノアッセイなどにより測定することができる。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体は、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩を認識し得る抗体であれば、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。

本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、抗体の説明においては、これらタンパク質等を単に本発明のタンパク質と略記する場合がある）に対する抗体は、本発明のタンパク質を抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

〔モノクローナル抗体の作製〕

（ａ）モノクロナール抗体産生細胞の作製

本発明のタンパク質は、温血動物に対して投与により抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常２～６週毎に１回ずつ、計２～１０回程度行われる。用いられる温血動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、ニワトリがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原で免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の２～５日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を同種または異種動物の骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後に記載する標識化タンパク質と抗血清とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー（Nature）、256、495（1975）〕に従い、実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール

（ＰＥＧ）やセンダイウィルスなどがあげられるが、好ましくはＰＥＧが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、ＮＳ－１、Ｐ３Ｕ１、ＳＰ２／０、ＡＰ－１などの温血動物の骨髄腫細胞があげられるが、Ｐ３Ｕ１が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は１：１～２０：１程度であり、ＰＥＧ（好ましくはＰＥＧ１０００～ＰＥＧ６０００）が１０～８０％程度の濃度で添加され、２０～４０℃、好ましくは３０～３７℃で１～１０分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、タンパク質抗原を直接あるいは担体とともに吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインＡを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインＡを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したタンパク質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができる。通常ＨＡＴ（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地で行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、１～２０％、好ましくは１０～２０％の牛胎児血清を含むＲＰＭＩ １６４０培地、１～１０％の牛胎児血清を含むＧＩＴ培地（和光純薬工業（株））あるいはハイブリドーマ培養用無血清培地（ＳＦＭ－１０１、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常２０～４０℃、好ましくは約３７℃である。培養時間は、通常５日～３週間、好ましくは１週間～２週間である。培養は、通常５％炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。

（b）モノクロナール抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、自体公知の方法、例えば、免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、ＤＥＡＥ）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相あるいはプロテインＡあるいはプロテインＧなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法に従って製造することができる。例えば、免疫抗原（タンパク質抗原）自体、あるいはそれとキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様に温血動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のタンパク質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造することができる。

温血動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どの様なものをどの様な比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミンやウシサイログロブリン、ヘモシアニン等を重量比でハプテン１に対し、約０．１～２０、好ましくは約１～５の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオピリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約２～６週毎に１回ずつ、計約３～１０回程度行なわれる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された温血動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

以下に、本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩（以下、本発明のタンパク質等と略記する場合がある）、および本発明のタンパク質もしくは部分ペプチドまたはその塩に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）の用途を説明する。

（1）本発明のタンパク質等を含有する各種疾病の治療・予防剤

本発明のタンパク質等は免疫細胞等で発現の見られる受容体であるＮＫＧ２Ｄに対する結合活性を有している。ＮＫＧ２ＤはＮＫ細胞を中心として一分のＴ細胞でも発現しており、これらの細胞を活性化する受容体として知られている。したがって、本発明のタンパク質用はＮＫＧ２Ｄを介して免疫細胞を活性化する作用が期待できる。その用途として、様々な疾患に対して、免疫賦活作用による治療や予防に使用することができる。すなわち細菌や新菌、ウイルス感染疾患に対する治療および予防剤の他、各種癌（例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等）などの疾病の治療・予防剤などの疾病の治療･予防剤などの医薬として使用できる。特に各種癌に対しては、免疫賦活作用に基いて癌腫摘出後の再発予防および根治のための医薬として有用である。

本発明のタンパク質等を上記の治療・予防剤として使用する場合は、少なくとも９０％、好ましくは９５％以上、より好ましくは９８％以上、さらに好ましくは９９％以上に精製されたものを使用するのが好ましい。

本発明のタンパク質等は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル

剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、本発明のタンパク質等を生理学的に認められる担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、Ｄ－ソルビトール、Ｄ－マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート８０™、ＨＣＯ－５０など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配

合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

本発明のタンパク質等の投与量は、対象疾患、投与対象などにより差異はあるが、例えば、抗癌剤として本発明のタンパク質等を投与する場合、一般的に成人（６０ｋｇとして）においては、一日につき該タンパク質等を約０．１ｍｇ～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。

（２）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング

本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物またはその塩、すなわち本発明のタンパク質のアンタゴニストは、免疫細胞を抑制する作用が期待できる。その用途として、自己免疫疾患や感染性の免疫過剰反応等の各種疾患に対して、さらに臓器や組織の移植後に拒絶反応抑制のため、免疫抑制剤や抗炎症剤として使用することができる。

また、本発明のタンパク質の活性を促進する化合物またはその塩、すなわち本発明のタンパク質のアゴニストは、本発明のタンパク質同様、様々な疾患に対して、免疫賦活作用による治療や予防に使用することができる。すなわち細菌や新菌、ウイルス感染疾患に対する治療および予防剤の他、各種癌（例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等）などの疾病の治療・予防剤などの疾病の治療･予防剤などの医薬として使用できる。

したがって、本発明のタンパク質等は、本発明のタンパク質等によるＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化を促進または阻害する活性を有する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用である。

すなわち、本発明は、

１．①本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を用いるこ

とを特徴とする本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩のＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化を促進または阻害する活性を有する化合物（「（２）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング」において促進剤または阻害剤と略記する場合がある）のスクリーニング方法（「（２）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング」において本発明のスクリーニング方法と称することもある）、②本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする阻害剤のスクリーニング用キット（「（２）疾病に対する医薬候補化合物のスクリーニング」において本発明のスクリーニング用キットと称することもある）を提供し、より具体的には、例えば、

２．①（ｉ）本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に基質を接触させた場合と（ii）本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩に基質および試験化合物を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする阻害剤のスクリーニング方法、②本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩および基質を含有することを特徴とする阻害剤のスクリーニング用キットを提供する。

具体的には、上記スクリーニング方法、スクリーニング用キットにおいては、例えば、（ｉ）と（ii）の場合における、本発明のタンパク質等のＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化などを測定して、比較することを特徴とするものである。

本発明のタンパク質等のＮＫＧ２Ｄに対する結合および免疫細胞の活性化は、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法などに従って測定することができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

基質としては、本発明のタンパク質等の基質となり得るものであれば何れのものでもよい。

例えば、上記（ii）の場合におけるＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化を上記（ｉ）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは約３０％以上、より好ましくは約５０％以上阻害する試験化合物を、本発明のタンパク質等のＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化をそれぞれ阻害する化合物として選択することができる。

また、上記（ii）の場合におけるＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化を上記（ｉ）の場合に比べて、約２０％以上、好ましくは約３０％以上、より好ましくは約５０％以上促進する試験化合物を、本発明のタンパク質等のＮＫＧ２Ｄに対する結合または免疫細胞の活性化をそれぞれ促進する化合物として選択することができる。

本発明のスクリーニング用キットは、本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩を含有するものである。本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

〔スクリーニング用試薬〕

１．測定用緩衝液

FBS（ウシ胎児血清）を含有するリン酸緩衝液

ｐＨ７、５のTris－ＨＣlバッファー（ＭｇＣ12、ＥＤＴＡ含有）

２．タンパク質標品

本発明のタンパク質、その部分ペプチドまたはそれらの塩とFcとの融合タンパク

３．KG2Dソース

KG2D 発現 CHO-K1 細胞

４．標識化抗体

抗ヒト IgG (Fc)-FITCコンジュゲート

５．検出

フローサイトメーター

〔測定法〕

KG2D 発現 CHO-K1 細胞に、上記タンパク質標品および試験化合物を加え、抗

ヒト IgG (Fc)-FITCコンジュゲートで標識を行い、フローサイトメータでKG2Dとの結合を測定する。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、本発明のタンパク質等のＮＫＧ２Ｄに対する結合を阻害する活性を有する化合物である。

該化合物の塩としては、上記した本発明のタンパク質の塩と同様のものが用いられる。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物を上記の治療・予防剤として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、上記した本発明のタンパク質等を含有する医薬と同様にして、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとすることができる。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトまたは温血動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、トリ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、その作用、対象疾患、投与対象、投与ルートなどにより差異はあるが、例えば、自己免疫疾患の治療目的で本発明のタンパク質等の細胞増殖活性を阻害する活性を有する化合物を経口投与する場合、一般的に成人（体重６０ｋｇとして）においては、一日につき該化合物を約０．１～１００ｍｇ、好ましくは約１．０～５０ｍｇ、より好ましくは約１．０～２０ｍｇ投与する。非経口的に投与する場合は、該化合物の１回投与量は投与対象、対象疾患などによっても異なるが、例えば、自己免疫疾患の治療目的で本発明のタンパク質等の細胞増殖活性を阻害する活性を有する化合物を注射剤の形で通常成人（６０ｋｇとして）に投与する場合、一日につき該化合物を約０．０１～３０ｍｇ程度、好ましくは約０．１～２０ｍｇ程度、より好ましくは約０．１～１０ｍｇ程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、６０

ｋｇ当たりに換算した量を投与することができる。

上記のスクリーニング方法を実施するには、本発明のタンパク質等を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することにより本発明のタンパク質等の標品を調製する。バッファーには、ｐＨ約４～１０（望ましくは、ｐＨ約６～８）のリン酸バッファー、トリス－塩酸バッファーなどの、本発明のタンパク質等と試験化合物との反応を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。

（３）本発明のタンパク質もしくはその部分ペプチドまたはその塩の定量

本発明のタンパク質等に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）は、本発明のタンパク質等を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質等の定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。

すなわち、本発明は、

（ｉ）本発明の抗体と、被検液および標識化された本発明のタンパク質等とを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化された本発明のタンパク質等の割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法、および

（ii）被検液と担体上に不溶化した本発明の抗体および標識化された本発明の別の抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のタンパク質等の定量法を提供する。

上記（ii）の定量法においては、一方の抗体が本発明のタンパク質等のＮ端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のタンパク質等のＣ端部に反応する抗体であることが望ましい。

また、本発明のタンパク質等に対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のタンパク質等の定量を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子のＦ（ａｂ’）$_2$、Ｆａｂ’、あるいはＦａｂ画分を用いてもよい。

本発明の抗体を用いる本発明のタンパク質等の定量法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、タンパク質量）に対応した抗体、抗原もしくは抗体－抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後に記載するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、〔^{125}I〕、〔^{131}I〕、〔^{3}H〕、〔^{14}C〕などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、β－ガラクトシダーゼ、β－グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン－アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また、通常、タンパク質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等があげられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した別の本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のタンパク質量を定量することができる。１次反応と２次反応は逆の順序に行っても、また、同時に行なってもよいし、時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は上記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用抗体に用いられる抗体は必ずしも１種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で２種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法による本発明のタンパク質等の測定法においては、１次反応と２次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体は、本発明のタンパク質等の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。すなわち、１次反応および２次反応に用いられる抗体は、例えば、２次反応で用いられる抗体が、本発明のタンパク質等のＣ端部を認識する場合、１次反応で用いられる抗体は、好ましくはＣ端部以外、例えばＮ端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいはネフロメトリーなどに用いることができる。

競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原（Ｆ）と、抗体と結合した標識抗原（Ｂ）とを分離し（Ｂ／Ｆ分離）、Ｂ，Ｆいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、Ｂ／Ｆ分離をポリエチレングリコール、上記抗体に対する第２抗体などを用いる液相法、および、第１抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第１抗体は可溶性のものを用い第２抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の定量方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のタンパク質等の測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる。

例えば、入江　寛編「ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和４９年発行）、入江　寛編「続ラジオイムノアッセイ」（講談社、昭和５４年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（医学書院、昭和５３年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第２版）（医学書院、昭和５７年発行）、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」（第３版）（医学書院、昭和６２年発行）、「Methods in ENZYMOLOGY」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies))(以上、アカデミックプレス社発行)などを参照することができる。

以上のようにして、本発明の抗体を用いることによって、本発明のタンパク質等を感度良く定量することができる。

さらには、本発明の抗体を用いて本発明のタンパク質等の濃度を定量することによって、本発明のタンパク質等の濃度の減少が検出された場合、例えば、各種癌（例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等）などの疾病である、または将来罹患する可能性が高いと診断することができる。

また、本発明の抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のタンパク質等を検出するために使用することができる。また、本発明のタンパク質等を精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のタンパク質等の検出、被検細胞内における本発明のタンパク質の挙動の分析などのために使用することができる。

本発明のタンパク質等の活性を中和する作用を有する本発明の抗体（中和抗体）は、例えば、自己免疫疾患や感染性の免疫過剰反応等の各種疾患に対して、さらに臓器や組織の移植後に拒絶反応抑制のため、免疫抑制剤や抗炎症剤として使用することができる。

以下、「（４）本発明の抗体を含有する医薬」において、本発明の中和抗体を本発明の抗体と称する場合がある。

本発明の抗体を含有する上記疾患の治療・予防剤は、そのまま液剤として、または適当な剤型の医薬組成物として、ヒトまたは哺乳動物（例、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して経口的または非経口的に投与することができる。投与量は、投与対象、対象疾患、症状、投与ルートなどによっても異なるが、例えば、成人の自己免疫疾患患者の治療・予防のために使用する場合には、本発明の抗体を１回量として、通常０．０１～２０ｍｇ／ｋｇ体重程度、好ましくは０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重程度、さらに好ましくは０．１～５ｍｇ／ｋｇ体重程度を、１日１～５回程度、好ましくは１日１～３回程度、静脈注射により投与するのが好都合である。他の非経口投与および経口投与の場合もこれに準ずる量を投与することができる。症状が特に重い場合には、その症状に応じて増量してもよい。

本発明の抗体は、それ自体または適当な医薬組成物として投与することができる。上記投与に用いられる医薬組成物は、上記またはその塩と薬理学的に許容され得る担体、希釈剤もしくは賦形剤とを含むものである。かかる組成物は、経口または非経口投与に適する剤形として提供される。

すなわち、例えば、経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤などがあげられる。かかる組成物は自体公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤もしくは賦形剤を含有するものである。例えば、錠剤用の担体、賦形剤としては、乳糖、でんぷん、蔗糖、ステアリン酸マグネシウムなどが用いられる。

非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤などが用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤などの剤形を包含する。かかる注射剤は、自体公知の方法に従って、例えば、上記抗体またはその塩を通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン界面活性剤〔例、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（polyoxyethylene（５０mol）adduct of hydrogenated castor oil）〕などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。直腸投与に用いられる坐剤は、上記抗体またはその塩を通常の坐薬用基剤に混合することによって調製される。

上記の経口用または非経口用医薬組成物は、活性成分の投与量に適合するような投薬単位の剤形に調製されることが好都合である。かかる投薬単位の剤形としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル）、坐剤などが例示され、それぞれの投薬単位剤形当たり通常５～５００ｍｇ、とりわけ注射剤では５～１００ｍｇ、その他の剤形では１０～２５０ｍｇの上記抗体が含有されていることが好ましい。

なお、上記した各組成物は、上記抗体との配合により好ましくない相互作用を生じない限り他の活性成分を含有してもよい。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、ＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ Commission on Biochemical Nomenclatureによる略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

DNA	:デオキシリボ核酸
cDNA	:相補的デオキシリボ核酸
A	:アデニン
T	:チミン
G	:グアニン
C	:シトシン
I	:イノシン
R	:アデニン（A）またはグアニン（G）
Y	:チミン（T）またはシトシン（C）
M	:アデニン（A）またはシトシン（C）
K	:グアニン（G）またはチミン（T）
S	:グアニン（G）またはシトシン（C）
W	:アデニン（A）またはチミン（T）
B	:グアニン（G）、グアニン（G）またはチミン（T）
D	:アデニン（A）、グアニン（G）またはチミン（T）
V	:アデニン（A）、グアニン（G）またはシトシン（C）
RNA	:リボ核酸
mRNA	:メッセンジャーリボ核酸
dATP	:デオキシアデノシン三リン酸
dTTP	:デオキシチミジン三リン酸
dGTP	:デオキシグアノシン三リン酸
dCTP	:デオキシシチジン三リン酸
ATP	:アデノシン三リン酸
Gly	:グリシン
Ala	:アラニン
Val	:バリン
Leu	:ロイシン
Ile	:イソロイシン

Ｓｅｒ　：セリン
Ｔｈｒ　：スレオニン
Ｃｙｓ　：システイン
Ｍｅｔ　：メチオニン
Ｇｌｕ　：グルタミン酸
Ａｓｐ　：アスパラギン酸
Ｌｙｓ　：リジン
Ａｒｇ　：アルギニン
Ｈｉｓ　：ヒスチジン
Ｐｈｅ　：フェニルアラニン
Ｔｙｒ　：チロシン
Ｔｒｐ　：トリプトファン
Ｐｒｏ　：プロリン
Ａｓｎ　：アスパラギン
Ｇｌｎ　：グルタミン
ｐＧｌｕ　：ピログルタミン酸

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Ｍｅ　：メチル基
Ｅｔ　：エチル基
Ｂｕ　：ブチル基
Ｐｈ　：フェニル基
ＴＣ　：チアゾリジン－４（Ｒ）－カルボキサミド基
Ｔｏｓ　：ｐ－トルエンスルフォニル
ＣＨＯ　：ホルミル
Ｂｚｌ　：ベンジル
Cl_2－Ｂｚｌ　：２，６－ジクロロベンジル
ＭＢｚｌ　：メトキシベンジル

MeBzl	：4－メチルベンジル
OcHex	：シクロヘキシルエステル
OBzl	：ベンジルエステル
Bom	：ベンジルオキシメチル
Z	：ベンジルオキシカルボニル
Cl－Z	：2－クロロベンジルオキシカルボニル
Br－Z	：2－ブロモベンジルオキシカルボニル
Boc	：t－ブトキシカルボニル
DNP	：ジニトロフェニル
Trt	：トリチル
Bum	：t－ブトキシメチル
Fmoc	：N－9－フルオレニルメトキシカルボニル
HOBt	：1－ヒドロキシベンズトリアゾール
HOOBt	：3，4－ジヒドロ－3－ヒドロキシ－4－オキソ－1，2，3－ベンゾトリアジン
HONB	：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
DCC	：N，N’－ジシクロヘキシルカルボジイミド
DMF	：N、N－ジメチルホルムアミド
TEA	：トリエチルアミン
WSCD	：1－エチル－3（3－ジメチルアミノプロピル）－カルボジイミド
EDTA	：エチレンジアミン四酢酸
SDS	：ドデシル硫酸ナトリウム

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

配列番号：1

実施例1で用いられたプライマー（合成）DNAの塩基配列を示す。

配列番号：2

実施例1で用いられたプライマー（合成）DNAの塩基配列を示す。

配列番号：３

配列番号：４で表わされるアミノ酸配列を有する本発明のヒト由来タンパク質をコードするＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：４

本発明のヒト由来タンパク質（ＣＳＰ２タンパク質）のアミノ酸配列を示す。

配列番号：５

実施例２で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：６

実施例２で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：７

FLAG 配列を示す。

配列番号：８

実施例６で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：９

実施例６で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：１０

実施例６で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：１１

実施例７で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

配列番号：１２

実施例７で用いられたプライマー（合成）ＤＮＡの塩基配列を示す。

以下の実施例１で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＪＭ１０９／ｐＣＲ２．１－ＣＳＰ２は、平成１２年３月１６日から茨城県つくば市東１－１－１　中央第６の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）に寄託番号ＦＥＲＭ　ＢＰ－７０９１として、平成１２年２月１６日から大阪府大阪市淀川区十三本町２－１７－８５の財団法人・発酵研究所（ＩＦＯ）に寄託番号ＩＦＯ　１６３６３として寄託されている。

以下に、実施例をあげて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はそれに限定されるものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）に記載されている方法に従った。

実施例１

ＣＳＰ２ｃＤＮＡのクローニング

ヒト腎臓ｃＤＮＡ（Marathon-Ready™ cDNA；Clontech 社）を鋳型とし、２個のプライマー、プライマー１（配列番号：１）およびプライマー２（配列番号：２）を用いてＰＣＲを行なった。ＰＣＲ反応には Advantage 2 Polymerase Mixture（Clontech 社）を用い、①９５℃、１分の後、②９５℃、３０秒、６２℃、３０秒、６８℃、２分を３０回の後、③６８℃、５分の伸長反応を行なった。反応後、反応産物をＴＡクローニングキット（Invitrogen 社）の処方に従い、プラスミドベクターｐＣＲ２．１（Invitrogen 社）へクローニングした。個々のクローンの配列を解析した結果、新規分泌タンパクをコードするｃＤＮＡ配列（配列番号：３）を得た。このｃＤＮＡより導き出されるアミノ酸配列配列番号：４）をＣＳＰ２と命名した。配列番号：３で表わされるｃＤＮＡを含有する形質転換体をエシェリヒア・コリ（Escherichia coli）ＪＭ１０９／ｐＣＲ２．１－ＣＳＰ２と命名した。

実施例２

ＣＳＰ２の動物細胞での発現ベクターの構築

ＣＳＰ２を動物細胞中で発現させるための発現ベクターは、ＣＳＰ２をコードするオープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を含むＤＮＡ断片を、動物細胞用発現ベクター pCAN618FLAG に挿入することによって得た。pCAN618FLAG はプラスミドベクター pCAN618（国際出願；ＰＣＴ　ＪＰ００／０５６８５号）に由来し、Sal Ｉ 部位直後に存在する８アミノ酸の FLAG 配列（配列番号：７；Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys）をコードする塩基配列と終止コドンにＯＲＦを合わせることで、該目的タンパクを FLAG 融合タンパクとして発現させることが可能である。まずＣＳＰ２タンパクをコードしている cDNA を鋳型にして、翻訳

開始コドンの直前に制限酵素 Mfe I 認識部位がくるように設計した合成 DNA (配列番号：5) と、ＣＳＰ２タンパクの 222 番目のアミノ酸の後に制限酵素 Sal I 認識部位がくるように設計した合成 DNA (配列番号：6) を用いてＰＣＲを行なった。ＰＣＲ反応には Advantage 2 Polymerase Mixture (Clontech 社) を用い、① 94℃ 1 分の後、② 98℃ 10 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分を 30 回の後、③ 72℃ 10 分の伸長反応を行なってＣＳＰ２のＯＲＦを含むＤＮＡ断片を得た。このＤＮＡ断片を TA Cloning Kit (Invitrogen 社) の処方に従い、プラスミドベクター pVR2.1-TOPO (Invitrogen 社) へクローニングした。得られたプラスミドを制限酵素 Mfe I 及び Sal I で切断して挿入断片を回収し、pCAN618FLAG の Eco RI／Sal I 部位に挿入してヒトＣＳＰ２タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618／CSP2-FLAG を得た。

実施例３

ＣＳＰ２のＣＯＳ－７細胞での発現

ＣＯＳ－７細胞 2×10^6 を、10% の FBS (ウシ胎児血清) を含む DMEM (培地； GibcoBRL) 中、10 cm シャーレで 24 時間培養した。これに、実施例２で得た発現ベクター pCAN618／CSP2-FLAG または対照ベクターpCAN618を、LipofectAMINE (GibcoBRL) を用いて細胞に導入し、さらに 18 時間培養した。次に培地を 0.05% CHAPS を含む Opti-MEM (培地；GibcoBRL) に換えてさらに 24 時間培養し、培養上清を回収した。遠心によって浮いている細胞を除いた後、上清１μｌに2-メルカプトエタノールを含む同量の SDS-Sample Buffer を加えて 16% Peptide-PAGE (TEFCO) で電気泳動し、これを PVDF 膜 (Amersham) に電気的に移した。一次抗体として抗 FLAG 抗体 (マウス IgG；Sigma) を用い、二次抗体にはHRP (Horseraddish peroxidase；西洋ワサビペルオキシダーゼ) 標識抗マウス IgG 抗体 (Amersham) を用いた。発色は、ECLplus ウエスタンブロット検出システム (Western Blot Detection System) (Amersham) を用いて５分間露光して行なった。結果は図１に示す。図１中、レーン２は発現ベクター (pCAN618／CSP2-FLAG) であり、レーン１は対照プラスミド (pCAN618) である。図１から明らかなように、抗 FLAG 抗体で認識される産物を培養上清中に確

認した。

実施例４　CSP2 タンパクの COS7 細胞培養上清からの精製

実施例３において CSP2 タンパクが COS7 細胞培養上清中に分泌されることが確認されたので、CSP2-FLAG タンパクを COS7 細胞培養上清中から精製した。実施例２で得た発現ベクターを実施例３の方法に従って 10 cm シャーレ 30 枚の COS7 細胞に導入し、培養上清を回収した。回収した培養上清は遠心によって細胞等を除いた後、anti-FLAG M2-agarose affinity gel（ SIGMA 社）に吸着させ、FLAG peptide（配列番号：７；Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ）で目的タンパクを溶出した。この溶出液を TBS 緩衝液（ pH 7.2 ）に対して透析し、Centricon-10（ Amicon 社）を用いて 500μl にまで濃縮し、精製標品を得た。これを SDS-PAGE にかけて銀染色を行なったところ、約 40 kDa の位置にブロードなバンドが検出された。またこれを Micro BCA Protein Assay Kit（ Piercr 社）を用いてタンパク定量したところ、15μg のタンパクが得られた。

実施例５　精製 CSP2-FLAG タンパクの N 末端アミノ酸配列の決定

実施例４で得られた精製標品のうち、２０μｌについて０．１％　ＴＦＡで希釈した後、ＰＶＤＦ膜に吸着して低分子夾雑物を除去した。これをプロテインシーケンサー　Procice 491 cLC (Applied Biosystems社) を用いてPL-Prosorbサイクルで分析した。その結果、主要産物としてN末端から順に、１．ヒスチジン（０．９２ｐｍｏｌ）、２．セリン（１．００ｐｍｏｌ）、３．ロイシン（１．８７ｐｍｏｌ）の各アミノ酸残基が得られた他、２番目の成分としてN末端から順に１．グリシン（０．７０ｐｍｏｌ）、２．ヒスチジン（０．４３ｐｍｏｌ）、３．セリン（０．６４ｐｍｏｌ）、４．ロイシン（１．１１ｐｍｏｌ）の各アミノ酸残基が検出された。このことからＣＳＰ２タンパクはその前駆タンパクのN末端の３０アミノ酸もしくは２９アミノ酸残基のシグナル配列が切断され、３１残基目のヒスチジン残基または３０残基目のグリシン残基から始まるＣＳＰ２成熟タンパクとして培地中に分泌されることが分った。

実施例6　CSP2 タンパクのヒト IgG Fc 領域との融合タンパクの発現

CSP2 をヒト IgG Fc 領域との融合タンパクとして発現させるための発現ベクターの構築は、以下の手順で行なった。まずヒト脾臓 IgG Fc cDNA（ Clontech 社）を鋳型として、制限酵素 Xho I または Not I 部位をアンカーとして持つ合成 DNA（配列番号：８及び９）を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Advantage 2 Polymerase Mixture（ Clontech 社）を用い、① 94℃ 1 分の後、② 96℃ 10 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分を 35 回の後、③ 72℃ 10 分の伸長反応を行なってヒト IgG Fc 領域をコードする DNA 断片を得た。この DNA 断片を TA Cloning Kit（Invitrogen 社）の処方に従い、プラスミドベクター pCR2.1-TOPO（ Invitrogen 社）へクローニングした。得られたプラスミドを制限酵素 Xho I 及び Not I で切断して挿入断片を回収し、pCAN618 の Xho I／Not I 部位に挿入して pCAN618Fc を得た。次に CSP2 タンパクをコードしている cDNA を鋳型にして、先の合成 DNA（配列番号：５）と、CSP2 タンパクの 221 番目のアミノ酸の後に制限酵素 Xho I 認識部位がくるように設計した合成 DNA（配列番号：１０）を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Advantage 2 Polymerase Mixture（ Clontech 社）を用い、① 94℃ 1 分の後、② 98℃ 10 秒、60℃ 30 秒、72℃ 1 分を 25 回の後、③ 72℃ 10 分の伸長反応を行なってCSP2 の ORF を含む DNA 断片を得た。この DNA 断片を制限酵素 Mfe I 及び Xho I で切断して回収し、pCAN618Fc の Eco RI／Xho I 部位に挿入してヒト CSP2 タンパクの動物細胞での発現ベクター pCAN618／CSP2-Fc を得た。

得られた発現ベクター pCAN618／CSP2-Fc は、実施例４と同様の方法で 10 cm シャーレ 2 枚分の COS7 細胞に導入して培養上清を回収した。回収した培養上清は遠心によって細胞等を除いた後、Centricon-10（ Amicon 社）を用いて 100 倍に濃縮した。タンパク発現の確認は、実施例３と同様の方法で、電気泳動し、これをPVDF 膜に移し、発色させて行なった（結果は図示せず）。

実施例7　ヒト NKG2D 発現 CHO-K1 細胞株の樹立

ヒト NKG2D を発現させるための発現ベクターは以下の方法で構築した。まずヒト脾臓 NKG2D cDNA（ Clontech 社）を鋳型として、制限酵素 Eco RI または

Not I 部位をアンカーとして持つ合成 DNA（配列番号：１１及び１２）を用いて PCR を行なった。PCR 反応には Advantage 2 Polymerase Mixture（ Clontech 社）を用い、① 95℃ 1 分の後、② 95℃ 20 秒、72℃ 4 分を 5 回、③95℃ 20 秒、68℃ 4 分を 5 回、④95℃ 20 秒、64℃ 20 秒、68℃ 4 分を 30 回の後、 ⑤68℃ 3 分の伸長反応を行なってヒト NKG2D をコードする DNA 断片を得た。この DNA 断片を TA Cloning Kit（Invitrogen 社）の処方に従い、プラスミドベクターpCR2.1-TOPO（ Invitrogen 社）へクローニングした。得られたプラスミドを制限酵素 Eco RI 及び Not I で切断して挿入断片を回収し、pCAN618 の Eco RI／Not I 部位に挿入して pCAN618／hNKG2D を得た。

得られた発現ベクター pCAN618／hNKG2D は、LipofectAMINE（ GibcoBRL ）を用いて CHO-K1 細胞に導入した。導入後 0.5 mg／ml の Geneticin（和光純薬）で発現ベクターの導入された細胞を選択し、ヒト NKG2D 発現 CHO-K1 細胞株 CHO-K1／hNKG2D-11 を得た。

実施例８ CSP2-Fc タンパクのヒト NKG2D 発現 CHO-K1 細胞への結合

実施例７で得たヒト NKG2D 発現 CHO-K1 細胞株 CHO-K1／hNKG2D-11 を、 PBS／1% FBS で 2 回洗浄後、実施例６で得た CSP2-Fc 発現 COS7 細胞の培養上清濃縮物 10μl を含む 50μl の PBS／1% FBS に懸濁した。これを 0℃ 60 分反応させて結合させた後、200μl の PBS／1% FBS で 2 回洗浄後、1μl の anti-human IgG (Fc)-FITC conjugate（ Caltag 社）を含む 50μl の PBS／1% FBS に懸濁した。これを 0℃ 60 分反応させて標識した後、200μl の PBS／1% FBS で 2 回洗浄後、 600μl の PBS／1% FBS に再懸濁した。これを フローサイトメーター FACSVantage（ Becton Dickinson 社）を用いて解析したところ、FITC 蛍光強度の強い細胞が認められ、CHO-K1 細胞表面に発現したヒト NKG2D に対して CSP2-Fc タンパクの明らかな結合が観察された（図２のＡ）。

また、同様にして、CHO-K1 細胞（コントロール）に対する、実施例６で得られた CSP2-Fc 発現 COS7 細胞の培養上清濃縮物の結合（図２のＢ）、ならびに上記CHO-K1／hNKG2D-11に対する、実施例６と同様の方法でMock プラスミドを導入して得られた Mock プラスミド導入 COS7 細胞の培養上清濃縮物の結合を調べ

た（図２のＣ）。

なお、細胞に結合した CSP2-Fc は、FITC 標識した anti-human IgG (Fc) 抗血清で染色した後、FACS を用いて検出した。

ヒト NKG2D 発現 CHO-K1 細胞に対しては、 CSP2-Fc 発現 COS7 細胞の培養上清濃縮物を加えた時に（図２のＡ）、 Mock プラスミド導入 COS7 細胞の培養上清濃縮物（図２のＢ）に比べて明らかに蛍光強度の増強が観察された。また NKG2D を発現していないコントロールの CHO-K1 細胞に対しては CSP2-Fc による蛍光強度の増強は見られなかった（図２のＣ）。これらＡ～Ｃの図を重ねたのが 図２のＤである。これらのことから、CSP2-Fc が CHO-K1 の細胞表面に発現した NKG2D に結合することが示され、NKG2D が CSP2 タンパクの特異的な受容体であることが分った。

産業上の利用の可能性

本発明のタンパク質等は、例えば、ＮＫＧ２Ｄに対する結合活性、免疫細胞の活性化作用などを有するため、各種癌（例、子宮体癌、子宮内膜腫瘍、乳癌、大腸癌、前立腺癌、肺癌、腎臓癌、神経芽腫、膀胱癌、黒色腫等）の予防・治療剤。また、本発明のタンパク質は、本発明のタンパク質の活性を促進もしくは阻害する化合物またはその塩のスクリーニングのための試薬として有用であり、スクリーニングによって得られる阻害剤は免疫抑制剤や抗炎症剤として期待される。

さらに、本発明のタンパク質に対する抗体は、本発明のタンパク質を特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のタンパク質の定量などに使用することができ、上記各種癌の診断剤として利用することができる。また、本発明のタンパク質に対するヒト化抗体は、免疫抑制剤や抗炎症剤として用いることができる。

配列表フリーテキスト

配列番号：１

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

配列番号：２

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

配列番号：5

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

配列番号：6

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

配列番号：7

FLAG sequence of pCAN618FLAG

配列番号：8

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding IgG Fc

配列番号：9

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding IgG Fc

配列番号：１０

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

配列番号：１１

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding NKG2D

配列番号：１２

Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding NKG2D

請 求 の 範 囲

1．配列番号：４で表されるアミノ酸配列と同一もしくは実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするタンパク質またはその塩。

2．請求の範囲第１項記載のタンパク質の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩。

3．請求の範囲第１項記載のタンパク質をコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ。

4．配列番号：３で表わされる塩基配列を有する請求の範囲第３項記載のＤＮＡ。

5．請求の範囲第２項記載の部分ペプチドをコードするＤＮＡを含有するＤＮＡ。

6．請求の範囲第３項または第５項記載のＤＮＡを含有する組換えベクター。

7．請求の範囲第６項記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。

8．請求の範囲第７項記載の形質転換体を培養し、請求の範囲第１項記載のタンパク質または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドを生成せしめることを特徴とする請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の製造法。

9．請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩に対する抗体。

１０．請求の範囲第３項もしくは第５項記載のＤＮＡまたは請求の範囲第９項記載の抗体を含有してなる診断剤。

１１．請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩あるいは請求の範囲第９項記載の抗体を含有してなる医薬。

１２．癌の予防・治療剤である請求の範囲第１１項記載の医薬。

１３．請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を用いることを特徴とする請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエ

ステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

１４．請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩を含有してなる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、または請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩のスクリーニング用キット。

１５．請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩。

１６．請求の範囲第１５項記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

１７．癌の予防・治療剤である請求の範囲第１６項記載の医薬。

１８．抗癌作用を有する医薬を製造するための①請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または②請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩の使用。

１９．①請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、または②請求の範囲第１２項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１３項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進する化合物またはその塩を哺乳動物に投与することを特徴とする癌の予防・治療方法。

２０．請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項

記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩。

２１．請求の範囲第２０項記載の化合物またはその塩を含有してなる医薬。

２２．免疫抑制剤または抗炎症剤である請求の範囲第２１項記載の医薬。

２３．免疫抑制作用または抗炎症作用を有する医薬を製造するための①請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、あるいは請求の範囲第９項記載の抗体の使用。

２４．請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を阻害する化合物またはその塩、あるいは請求の範囲第９項記載の抗体を哺乳動物に投与することを特徴とする免疫抑制方法または炎症の治療方法。

図1

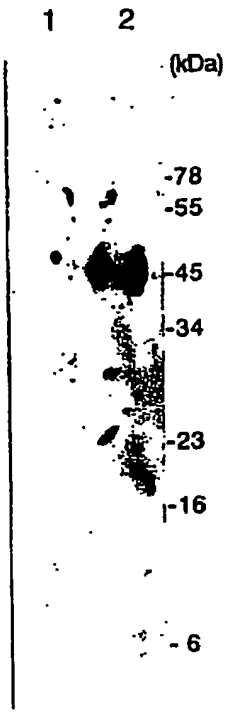
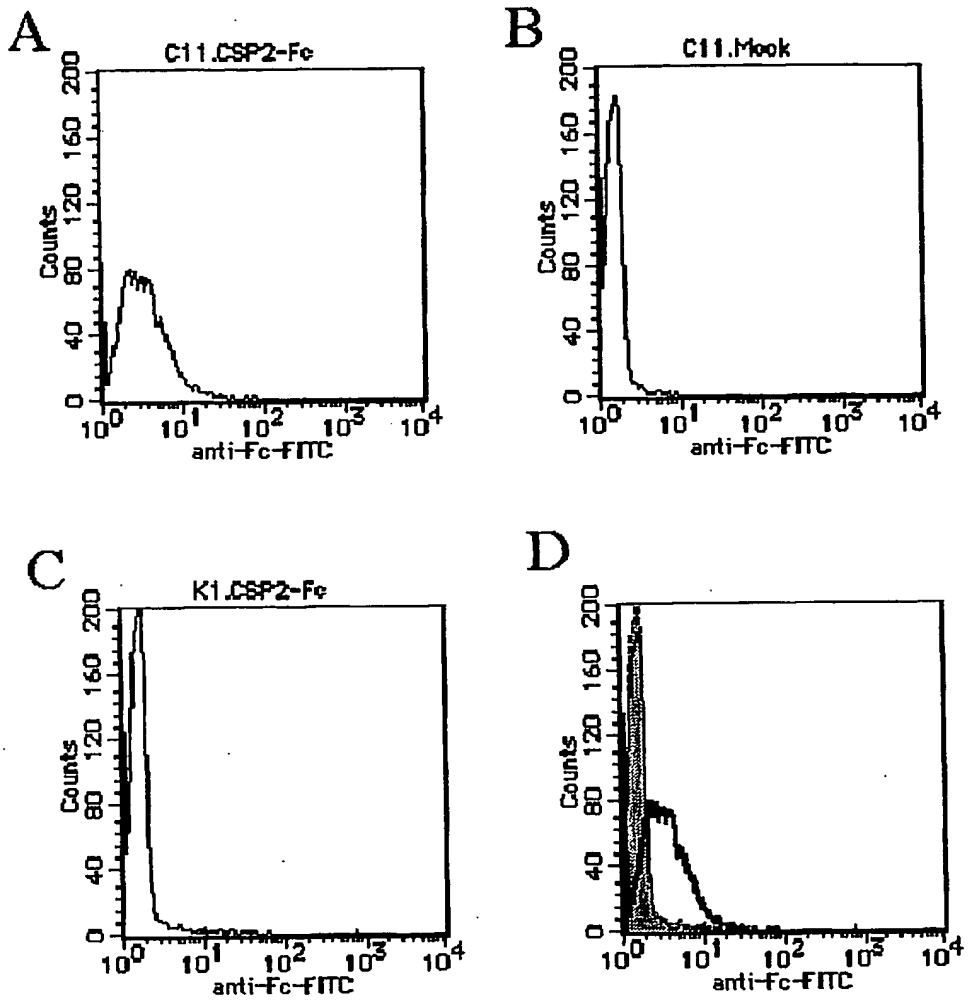


図2



SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel Protein and Its Use

<130> 662523

<150> JP 2000-127547

<150> 2000-04-27

<150> JP 2001-64862

<150> 2001-03-08

<160> 12

<210> 1

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

<400> 1

ctcgagacgc ccagcttcct gcctgttact 30

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

<400> 2

CTCGAGGTGG GAGCCAAGGC TGTCAGCGAT 30

<210> 3

<211> 765

<212> DNA

<213> Human

<400> 3

atgcgaagaa tatccctgac ttctagccct gtgcgccttc ttttgtttct gctgttgcta 60

ctaatagcct tggagatcat ggttggtggt cactctcttt gcttcaactt cactataaaa 120

tcattgtcca gacctggaca gccctggtgt gaagcgcagg tcttcttgaa taaaaatctt 180

ttccttcagt acaacagtga caacaacatg gtcaaacctc tgggcctcct ggggaagaag 240

gtaaatgcca ccagcacttg gggagaattg acccaaacgc tgggagaagt ggggcgagac 300

ctcaggatgc tcctttgtga catcaaaccc cagataaaga ccagtgatcc ttccactctg 360

caagtcgaga tgttttgtca acgtgaagca gaacggtgca ctggtgcatc ctggcagttc 420

gccatcaatg gagagaaatc cctcctcttt gacgcaatga acatgacctg gacagtaatt 480

aatcatgaag ccagtaagat caaggagaca tggaagaaag acagagggct ggaaaagtat 540

ttcaggaagc tctcaaaggg agactgcgat cactggctca gggaattctt agggcactgg 600

gaggcaatgc cagaaccgac agtgtcacca gtaaatgctt cagatatcca ctggtcttct 660

tctagtctac cagatagatg gatcatcctg ggggcattca tcctgttact tttaatggga 720

attgttctca tctgtgtctg gtggcaaaat ggcagaagat ccacc 765

<210> 4

<211> 255

<212> PRT

<213> Human

<400> 4

Met Arg Arg Ile Ser Leu Thr Ser Ser Pro Val Arg Leu Leu Leu Phe
5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Ile Ala Leu Glu Ile Met Val Gly Gly His Ser
20 25 30

Leu Cys Phe Asn Phe Thr Ile Lys Ser Leu Ser Arg Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Trp Cys Glu Ala Gln Val Phe Leu Asn Lys Asn Leu Phe Leu Gln Tyr
50 55 60

Asn Ser Asp Asn Asn Met Val Lys Pro Leu Gly Leu Leu Gly Lys Lys
65 70 75 80

Val Asn Ala Thr Ser Thr Trp Gly Glu Leu Thr Gln Thr Leu Gly Glu
85 90 95

Val Gly Arg Asp Leu Arg Met Leu Leu Cys Asp Ile Lys Pro Gln Ile
100 105 110

Lys Thr Ser Asp Pro Ser Thr Leu Gln Val Glu Met Phe Cys Gln Arg
115 120 125

Glu Ala Glu Arg Cys Thr Gly Ala Ser Trp Gln Phe Ala Ile Asn Gly
130 135 140

Glu Lys Ser Leu Leu Phe Asp Ala Met Asn Met Thr Trp Thr Val Ile
145 150 155 160

Asn His Glu Ala Ser Lys Ile Lys Glu Thr Trp Lys Lys Asp Arg Gly
165 170 175

Leu Glu Lys Tyr Phe Arg Lys Leu Ser Lys Gly Asp Cys Asp His Trp
180 185 190

Leu Arg Glu Phe Leu Gly His Trp Glu Ala Met Pro Glu Pro Thr Val
195 200 205

Ser Pro Val Asn Ala Ser Asp Ile His Trp Ser Ser Ser Ser Leu Pro
210 215 220

Asp Arg Trp Ile Ile Leu Gly Ala Phe Ile Leu Leu Leu Leu Met Gly
225 230 235 240

Ile Val Leu Ile Cys Val Trp Trp Gln Asn Gly Arg Arg Ser Thr
245 250 255

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

<400> 5

caattgccac catgcgaaga atatccctga cttct 35

<210> 6

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

<400> 6

gtcgacacta gaagaagacc agtggatatc t 31

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FLAG sequence of pCAN618FLAG

<400> 7

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys 8

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding IgG Fc

<400> 8

ctcgagatct tgtgacaaaa ctcacacatg 30

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding IgG Fc

<400> 9

gcggccgctc atttacccgg agacagggag 30

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding CSP2

<400> 10

gtagactcga ggaagaccag tggatatctg aagca 35

<210> 11

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding NKG2D

<400> 11

atgaattcca ccatggggtg gattcgtggt cggaggtctc ga 42

<210> 12

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify DNA encoding NKG2D

<400> 12

aagcggccgc ttacacagtc ctttgcatgc agatgtag 38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03672

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395, G01N33/50

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
Swissprot/PIR/GeneSeq
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/31236 A2 (Genset), 24 June, 1999 (24.06.99), SEQ ID Nos:320, 456 & EP 1037977 A2 & AU 9915030 A	1-14
X	WO 99/06554 A2 (Genset), 11 February, 1999 (11.02.99), SEQ ID Nos:70, 338 & EP 1000152 A2 & AU 9885557 A	1-14
X	EP 1033401 A2 (Genset), 21 February, 2000 (21.02.00), SEQ ID No:402 & CA 2296792 A1	1-14
PX	WO 01/07611 A2 (Genentech, Inc.), 01 February, 2001 (01.02.01), Fig. 402 & AU 200061170 A	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
18 July, 2001 (18.07.01)	31 July, 2001 (31.07.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03672

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Perez-Rodriguez M.et al. "A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite", Tissue Antigens, February, 2000, Vol.55, pages 162 to 165, abstract, (BIOSIS Acc.No.2000:179115)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/03672

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 19,24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

These claims pertain to methods for treatment of the human body by surgery or therapy.

2. ☒ Claims Nos.: 15-18,20-23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

(See extra sheet.)

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No. I-2 of continuation of first sheet (1)

Concerning the compounds promoting or inhibiting the activity of the protein or its salt as described in claim 1 and the peptide fragment or its amide, ester or salt as described in claim 2 which are obtained by using the screening method as set forth in claim 13 or the screening kit as set forth in claim 14, no particular compound is disclosed in the examples, etc. of the description. Moreover, it is not described what compounds fall within the scope thereof. Therefore, it is completely unknown what compounds are involved in the scope thereof in practice. Such being the case, the inventions as set forth in the above claims are not so clear as to enable the practice of any meaningful international search.

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP01／03672

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C07K14/47, C12N15/12, C12P21/02, C07K16/18, A61K39/395, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
Swissprot/PIR/GeneSeq
WPIDS/BIOSIS/BIOTECHABS/MEDLINE/CA (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	WO 99/31236 A2 (Genset) 24.6月.1999(24.06.99), SEQ ID NOs:320,456 & EP 1037977 A2 & AU 9915030 A	1-14
X	WO 99/06554 A2 (Genset) 11.2月.1999(11.02.99), SEQ ID NOs:70,338 & EP 1000152 A2 & AU 9885557 A	1-14
X	EP 1033401 A2 (Genset) 21.2月.2000(21.02.00), SEQ ID NO:402 & CA 2296792 A1	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
18.07.01	31.07.01

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	4B	9548
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	深草 亜子		
	電話番号 03－3581－1101 内線 3448		

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1998年7月）

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP01/03672

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第８条第３項（ＰＣＴ１７条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 19, 24 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法である。

2. ☒ 請求の範囲 15-18, 20-23 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

（特別ページに記載）

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第３文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

国際調査報告	国際出願番号 PCT／JP01／03672

C（続き）. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
PX	WO 01/07611 A2 (Genentech, Inc.) 1.2月.2001(01.02.01), Fig.402 & AU 200061170 A	1-14
A	Perez-Rodriguez M. et al., A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite, Tissue Antigens, Feb. 2000, Vol.55, p.162-165 Abstract (BIOSIS Acc.No.2000:179115)	1-14

第Ⅰ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）の続き

請求の範囲第１３項記載のスクリーニング方法または請求の範囲第１４項記載のスクリーニング用キットを用いて得られる請求の範囲第１項記載のタンパク質もしくはその塩、請求の範囲第２項記載の部分ペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩の活性を促進または阻害する化合物またはその塩、については明細書中に実施例等をもって何ら具体的な化合物が開示されておらず、また、どのような化合物が包含されるかに関する他の記載もない。したがって、実際にどのような化合物が包含されるかは全く不明であり、上記請求の範囲に記載された発明は有意義な国際調査をすることができる程度まで明確でない。